

3. ボルナ病ウイルスの神経病原性に関する研究

本田 知之

京都大学ウイルス研究所ヒトがんウイルス研究分野

ボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) は、強い神経指向性を持ち、中枢神経系へ持続感染するマイナス鎖 RNA ウイルスである。自然感染した動物では、致死性脳炎から軽微な神経症状まで、様々な神経症状を呈する。BDV 感染による病原性発現の分子メカニズムについては、未だ不明な点が多い。細胞非傷害性である BDV の病原性は、必ずしもウイルス量に相関せず、感染細胞の質的変化・機能異常によるものと考えられる。これは多くの細胞傷害性ウイルスの病原性がウイルス量と相関するのと大きく異なる。本稿では、BDV 感染による病原性発現機構について、私たちが見出した2つの現象を紹介する。グリア細胞は、BDV P タンパク質発現により、周辺の IGF シグナルの異常を引き起こし、BDV 感染病態を誘導する。一部の感染細胞では、BDV mRNA の逆転写と宿主ゲノムへのインテグレーションが起こる。この挿入配列は、BDV タンパク質のバランス変化、BDV を認識する piRNA 産生、周辺遺伝子の発現変化などを引き起こしうる。BDV 感染動物では、これらが複雑に絡み合い、様々な症状を呈しているものと考えられる。

はじめに

ボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) は、全長 8.9kb からなる非分節一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムに持つモノネガウイルス目に属するウイルスである^{1,2)}。現在、ボルナウイルス科ボルナウイルス属には、ほ乳類に感染する BDV や鳥類に感染する鳥ボルナウイルスなどが同定されている³⁾。BDV は、主には乳類の中枢神経系に、急性あるいは持続的に感染する。急性感染は、重篤な致死性脳炎 (ボルナ病) を引き起こす。持続感染では、不顕性感染から軽微な神経症状を呈する症例までその病態は様々である。BDV 持続感染ラットは、ヒトの自閉症に類似した様々な行動異常を認めることから、ウイルス感染を用いた自閉症モデルとして研究されている⁴⁾。BDV の感染は世界各地で報告されており、我が国でも神経症状を呈する

ウシやネコからの BDV 検出が報告されている^{5,6)}。ヒトにおいても、その割合は低いものの、BDV あるいは BDV に類似したウイルスが感染していることは間違いないと考えられている。本稿では、私たちがこれまでに研究してきた BDV 持続感染による神経病原性発現メカニズムの中で、ウイルスタンパク質の持つ病原性とウイルスによる感染細胞ゲノム改変による病原性について解説する。

1. BDV 持続感染の病態

1-1. BDV の感染経路

BDV は、神経線維に沿って中枢神経系に侵入する。中枢神経系に侵入後は、まず扁桃体や海馬などの辺縁系に感染し、その後脳全体に広がる⁷⁾。BDV の伝播・感染経路については不明な点が多い。そもそも、BDV の感染受容体はまだ発見されていない。私たちは、宿主のシャペロンタンパク質である BiP (immunoglobulin heavy chain-binding protein) が、細胞表面に存在し、BDV の唯一の膜タンパク質である G タンパク質と相互作用することを見出した⁸⁾。また、BiP は細胞表面に局在し、BDV 感染効率を制御する分子であることが明らかとなった。神経細胞においては、神経シナプスで細胞表面に露出された BiP を検出出来る。BiP の細胞表面への局在は、BiP 自身が膜貫通領域を持たないため、他の膜貫通分子を介していると考えられる。これらを総合すると、BDV は、シナプス表面に局

連絡先

〒 606-8507

京都府京都市左京区聖護院川原町 53

京都大学ウイルス研究所 ヒトがんウイルス研究分野

TEL: 075-751-4034

FAX: 075-751-4000

E-mail: thonda@virus.kyoto-u.ac.jp

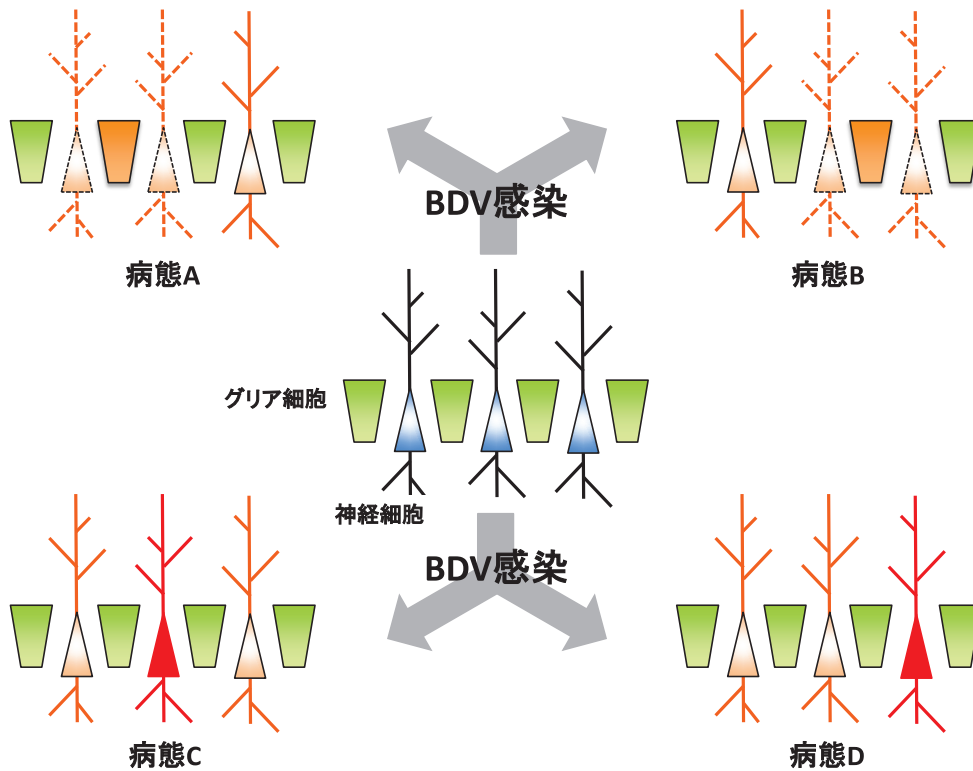


図1 BDV感染により様々な病態が生じるメカニズム

非感染状態（中央）では、神経細胞（水色）をグリア細胞（緑）が支持している。BDV感染時には、神経細胞はすべてがBDV持続感染細胞（橙）である。上段：グリア細胞への感染は局所的で、その周辺の神経細胞のみに機能障害が生じる（破線の神経細胞）。機能障害が生じる神経細胞のパターンにより病態が異なる。下段：神経細胞はそれぞれ神経回路における役割が異なる。一部の感染細胞でのみ発生する感染現象があれば、その発生した神経細胞（赤）のパターンにより病態が異なる。

在する未だ同定されていないBDV受容体とBiPとの複合体を認識して、シナプス間を伝播している可能性が考えられた^{8,9)}。未だ同定されていない受容体の候補としては、BDVに易感染性の細胞の分布より、シナプス伝達に関わるカインニン酸型グルタミン酸受容体が疑われている¹⁰⁾。BiPはグルタミン酸受容体と相互作用し、その膜表面への輸送を制御することが知られている¹¹⁾。BDV感染の病原性は、BiPを介したグルタミン酸受容体輸送系をBDVが攪乱することに起因するのかも知れない。

1-2. BDV感染動物の病態

BDV感染の病態は、感染する動物の免疫状態や年齢に大きく左右されることが知られている¹²⁾。その病態は、2通りに大別出来る。免疫状態が成熟した動物への感染では、細胞性免疫が惹起され、運動神経障害を伴う髄膜脳炎を発症する。免疫系が未成熟もしくは低下した動物への感染では、免疫寛容となり、免疫反応を伴わない持続感染が成立する。

BDV急性感染では、まず神経細胞に感染し、その後アストロサイトなどのグリア細胞にも感染を拡大する。これらの感染細胞は、脳内に浸潤してきた免疫系細胞により傷

害される。BDVの感染とそれに対する免疫応答が脳全体に進行することで、運動障害などの神経症状を呈し、最終的には死に至る。

一方、BDVが持続感染した仔ラットでは、成熟後、顕著な脳の低形成、特に小脳や海馬の神経細胞層の萎縮が認められる²⁾。行動学的解析では、社会性の低下や攻撃性の上昇をはじめとする情動行動異常を呈する⁴⁾。このような病態は自閉症の病態と共通点が多く、BDV感染仔ラットが自閉症モデル動物として関心を寄せられる所以となっている。

1-3. 多様なBDV感染病態を説明する作業仮説

BDV持続感染動物の症状は、すべての例で高次脳機能障害を呈するわけではなく、不顕性感染から運動神経障害まで様々である。実際、不顕性のBDV持続感染マウスでも、脳全体にウイルス感染は広がっているのが確認される。つまり、BDV感染に加え、何か他の要素がBDV持続感染病態を規定していると考えられる。最も考えやすいのが、感染する細胞種の違いである（図1上段）。脳組織は、様々な神経細胞とグリア細胞からなる多様な細胞種の集まりである。一見すると脳全体にウイルスが広がっていても、上

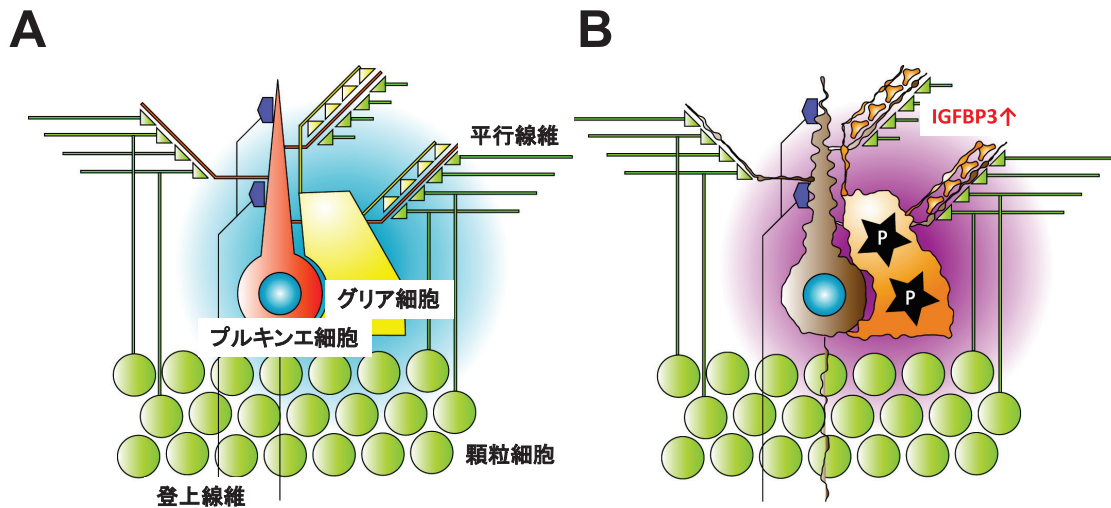


図2 P-Tgにおける小脳プルキンエ細胞脱落のメカニズム

(A) 野生型マウス小脳の回路図。プルキンエ細胞はグリア細胞により支持されている。グリア細胞が提供する微小環境により、適切な神経活動が行なわれている。(B) P-Tg小脳の回路図。グリア細胞にPが発現することで、グリア細胞から分泌されるIGFBP3量が増加する。その結果、プルキンエ細胞周辺の微小環境が変容し、プルキンエ細胞が機能不全となり脱落する。

述のように、感染が拡大しにくいグリア細胞への感染は局所的である可能性がある。実際、グリア細胞のBDV病態への関与を指摘する報告もある^{13,14}。つまり、グリア細胞へのBDV感染の程度が、BDV持続感染病態を規定する一つの要因なのかも知れない。グリア細胞がもたらす影響の例は、2.の項で紹介する。別の魅力的な可能性として、個々の神経細胞の違いに着目することも出来る(図1下段)。同じ脳領域にある神経細胞であっても、神経回路という視点で見ると、一つとして同じ神経細胞は存在しない。もし、BDV感染により一部の感染神経細胞の性質が変化するとしたら、神経細胞機能の総和としての高次脳機能も様々に変化する。私たちは、BDV感染により一部の感染細胞でのみ変化する性質として、BDV感染細胞におけるゲノム情報の改変を見出した。これについては、3.の項で解説する。

2. BDV タンパク質による病原性

2-1. P タンパク質発現トランスジェニックマウスにおける自閉症様行動異常

私たちのグループは、これまでの研究で、BDVのPタンパク質がBDV感染病態の一役を担っていることを明らかにしてきた¹⁵。そこで、私たちは、グリア細胞でのPタンパク質の病原性を明らかにするために、Pタンパク質をグリア細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウス(P-Tg)を作製した。P-Tgは成長にともない、社会性の異常や空間記憶能力の低下といった自閉症様の行動異常を示した¹⁶。病理学的には、脳内シナプス数の減少や小脳

プルキンエ細胞の脱落をP-Tgで認めた^{16,17}。小脳プルキンエ細胞の脱落は、BDV感染動物でも認められる病態であるのみならず、自閉症患者死後脳研究において最も再現性よく観察されている病態である¹⁸。小脳は分葉構造をとっており、前葉は主に運動機能を、後葉は運動と高次脳機能を司ることが知られている。P-Tgにおけるプルキンエ細胞脱落は、後葉優位に認められた。自閉症患者における小脳萎縮も後葉、特に第VI/VII小葉で優位に認められるとの報告もある¹⁹。これらのことから、BDV持続感染病態に関与するPタンパク質の病原性として、小脳プルキンエ細胞の脱落が考えられた。

そこで、私たちはこの小脳プルキンエ細胞脱落の分子メカニズムを明らかにするために、グリア細胞においてP発現により誘導される遺伝子の探索を行なった。その結果、IGF (insulin-like growth factor) シグナルを負に制御する分子IGFBP3 (IGF binding protein 3) が、P発現により増加することを見出した^{17,20}。IGFは、インスリン配列と類似したポリペプチドである。IGFは、IGF受容体と結合することでIGFシグナルを活性化し、神経細胞の生存や機能を制御する^{21,22}。つまり、P発現によりグリア細胞で増加したIGFBP3が、その周辺でIGFシグナルを減弱させ、その結果小脳ではプルキンエ細胞の生存が抑制されると考えられた(図2)。実際、P-Tg小脳において、IGF受容体の活性化を指標にIGFシグナルを検討したところ、IGFシグナルの低下を確認出来た。IGFやインスリンを用いたIGFシグナルの是正により、P-Tgにおけるプルキンエ細胞の脱落が抑制できることも明らかとなった。これらのこ

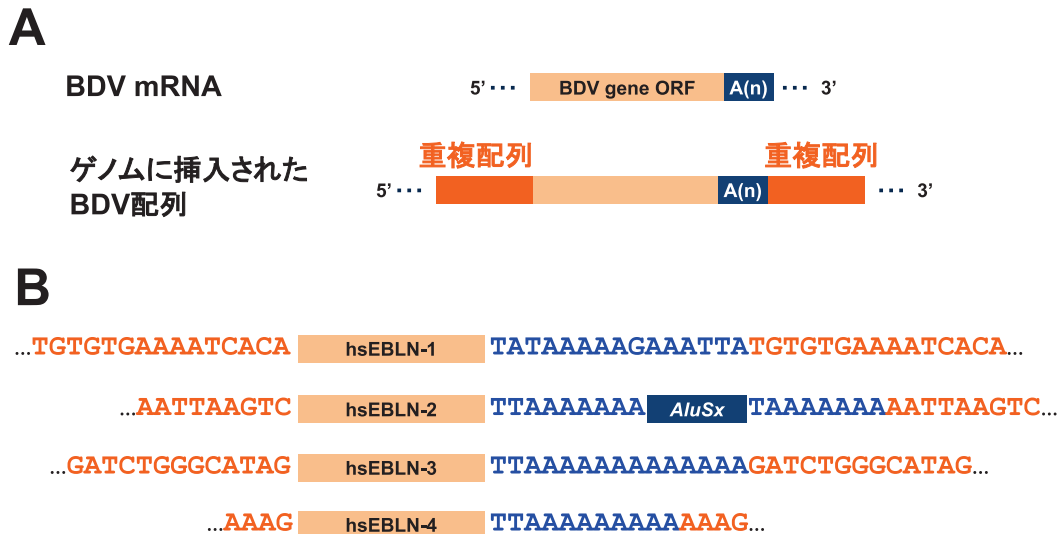


図3 宿主ゲノムへのBDV mRNA配列のインテグレーション構造

(A) 感染細胞で認めたBDV DNAのインテグレーション構造。挿入配列の5'末端側がBDVの転写開始部位もしくはその下流であること、3'末端側がBDV mRNAの転写終止部位からポリA配列が続く配列であったこと(青)、挿入部位の両端に宿主ゲノムの重複配列が観察されたこと(橙)、の3つの特徴があった。(B) ヒトゲノムにおけるEBLNのインテグレーション構造。ヒトEBLN-1~4の挿入部位配列を示す。それぞれボルナウイルスのN遺伝子と同一性が高い。青字はポリA配列、橙字は重複配列を示す。AluSxは、宿主のレトロトランスポゾンであるSINE(短鎖散在反復配列)の一種である。

とから、P-Tgで認められるプルキンエ細胞の脱落が、P発現グリア細胞によるIGFシグナル異常に起因することが明らかとなった¹⁷⁾。

2.2. ウイルス病原性を用いた精神疾患モデルの有用性

P-Tgの解析結果は、BDV感染病態とIGFシグナル異常との関連性を示唆するのみならず、自閉症様病態とIGFシグナル異常との関連性を示唆するとも考えられる。実際、自閉症患者でIGFBP3の発現上昇やIGFシグナル異常が報告されている^{23, 24)}。さらに、自閉症モデルマウスの行動異常が、IGF投与により部分的に改善することなども示された^{25, 26)}。現在、米国ではこれらの報告をふまえて、自閉症患者の治療としてのIGF投与について幾つかの臨床試験が行なわれているところである²⁵⁾。このような例は、ウイルスが実際に精神疾患の原因であるかは不明でも、ウイルス病原性を利用した精神疾患モデルを構築することで、精神疾患の病態を解析するというアプローチが可能であることを端的に示している。

3. BDV感染による宿主ゲノム改変

3.1 内在性ボルナウイルス様配列の発見

最近、私たちのグループは、BDVのN遺伝子類似配列がヒトをはじめとする多くのほ乳類のゲノム内に存在することを発見した²⁷⁾。遺伝学的解析により、これらの配列はBDVのNタンパク質と同一起源であることが明らかとなった。このことは、これらの配列が、過去に感染したボ

ルナウイルスのN遺伝子の内在化産物であることを示唆する。私たちは、これらの内在化配列を、内在性ボルナウイルス様ヌクレオプロテイン(Endogenous bornavirus-like nucleoprotein: EBLN)と名付けた。ヒトゲノム中には少なくとも7カ所にEBLNが存在している。系統樹解析からは、ヒトを含む霊長類由来のEBLNは、少なくとも4,000~4,500万年前までには霊長類の共通祖先において内在化したと考えられた。これは、太古におけるレトロウイルス以外のRNAウイルスの存在およびその感染を示した初めての証拠である。

3.2. BDV mRNA配列の宿主ゲノムへのインテグレーション

EBLNは、上述のように、太古にボルナウイルス感染細胞においてN遺伝子が内在化したものである。太古に起こったであろうこのような現象は、現存のボルナウイルスであるBDVを用いて再現出来るのだろうか? 私たちは、BDV持続感染細胞から全DNAを抽出し、BDV配列を持ったDNAの検出を試みた²⁷⁾。その結果、BDVのmRNAを鋳型とするDNAが、感染細胞内に形成されていることが明らかとなった。さらに、Alu-PCR法を用いた解析から、BDV由来DNAが宿主ゲノムDNAにインテグレーション(挿入)されていることが示された。これらのことから、BDVが自身のmRNAを感染細胞のゲノムに組み込むことが実験的に証明されたわけである。

一般的に、レトロウイルス以外のRNAウイルス感染では、ウイルスゲノムに逆転写酵素がコードされていないた

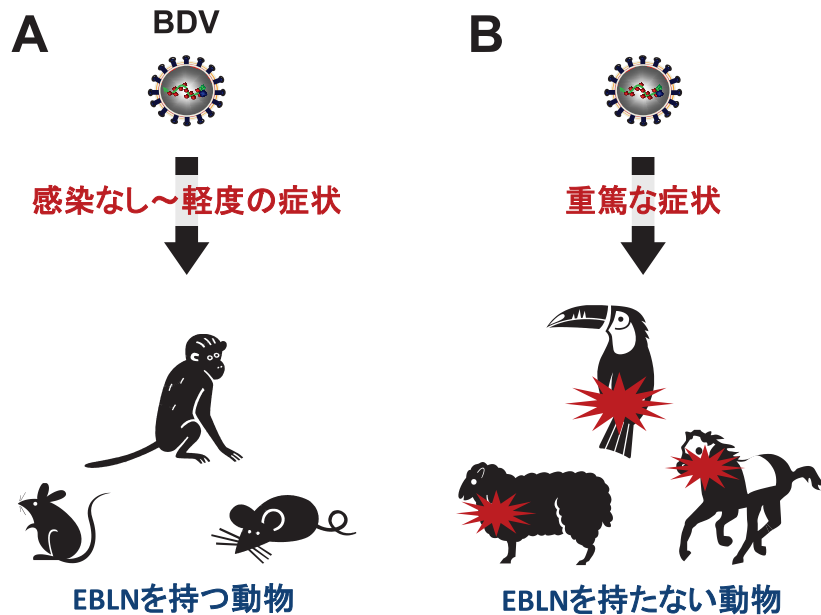


図4 様々な動物種における EBLN の有無と BDV に対する感受性

(A) EBLN を持つ動物. BDV の自然感染は認められないか, 感染してもその病原性は軽いことが多い. (B) EBLN を持たない動物. BDV 感染は, 致死性脳炎 (ボルナ病) を引き起こす.

め, そのウイルス生活環は RNA のみで完結する. 一方, N 遺伝子が宿主ゲノム DNA に内在化するためには, どこかの段階でウイルス RNA の遺伝子情報を DNA に変換 (逆転写) する必要がある. それでは, BDV 持続感染細胞において, BDV mRNA を逆転写するメカニズムは何なのだろうか? BDV DNA の感染細胞ゲノムへの挿入部位および配列を解析した結果, 挿入配列の 5' 末端側が BDV の転写開始部位もしくはその下流であること, 3' 末端側が BDV mRNA の転写終止部位からポリ A 配列が続く配列であったこと, 挿入部位の両端に宿主ゲノムの重複配列が観察されたこと, の 3 つの特徴が見出された (図 3)²⁷⁾. これらは, EBLN 配列の特徴と極めて類似している. 同時に, これらの配列は宿主のトランスポゾン的一种である非 LTR 型レトロトランスポゾン LINE (long interspersed nuclear element) に認められる特徴でもあった^{28, 29)}. 宿主ゲノム中の LINE から転写された mRNA は, 逆転写酵素を含む LINE タンパク質を合成する³⁰⁾. LINE タンパク質は, 自身の mRNA を認識して, ゲノムへのインテグレーションを触媒し, 転移を完了させる. まれに, 自分以外の mRNA の逆転写, インテグレーションを触媒し, 偽遺伝子を形成することも知られている^{28, 29)}. つまり, 感染細胞において, BDV mRNA は LINE の活性により逆転写され, ゲノムにインテグレーションされていると考えられた. この現象は, 宿主の mRNA の逆転写がまれであるのと同様に, 少なくともレトロウイルスの逆転写のように高頻度には起こっていないようである³¹⁾. このことは, BDV

mRNA 配列のインテグレーション現象が, 一部の感染細胞でのみ出現する感染現象であり, 感染細胞の多様性, ひいては感染病態の多様性を生み出す基盤となりうることを意味する.

3.3. BDV 感染による宿主ゲノム改変と BDV 感染の制御

それでは, この BDV mRNA の感染細胞のゲノムへのインテグレーション現象の生理意義は何なのであろうか? この意義を考える上で, 同じ機構で形成されたと考えられるほ乳類ゲノム中の EBLN が持つ機能は興味深い. 私たちが見出した EBLN 配列のほとんどは偽遺伝子化している²⁷⁾. それにもかかわらず, これらの配列からは, 多くの場合 RNA が転写されている (論文投稿中). また, 一部の EBLN は極めて長いオープンリーディングフレームを保持しており, 発現レベルは低いもののタンパク質としても発現している³²⁾. これらの事実, 少なくとも一部の EBLN 配列が, 何らかの生理意義を持っている可能性を想像させる³³⁾.

図 4 は, 様々な動物種における EBLN の有無と BDV に対する感受性の相関性を示したものである. ヒトをはじめとする EBLN を持つ動物では, BDV の自然感染は認められないか, 感染してもその病原性は軽いことが多い. 一方, BDV が致死性脳炎 (ボルナ病) を引き起こすウマやヒツジは, EBLN を有していない. このように, EBLN を持つ動物と BDV 感染の病原性にはある程度の相関性が認められる. この相関性を説明する魅力的な仮説として, EBLN 配列がタンパク質もしくは RNA レベルで BDV の感染あ

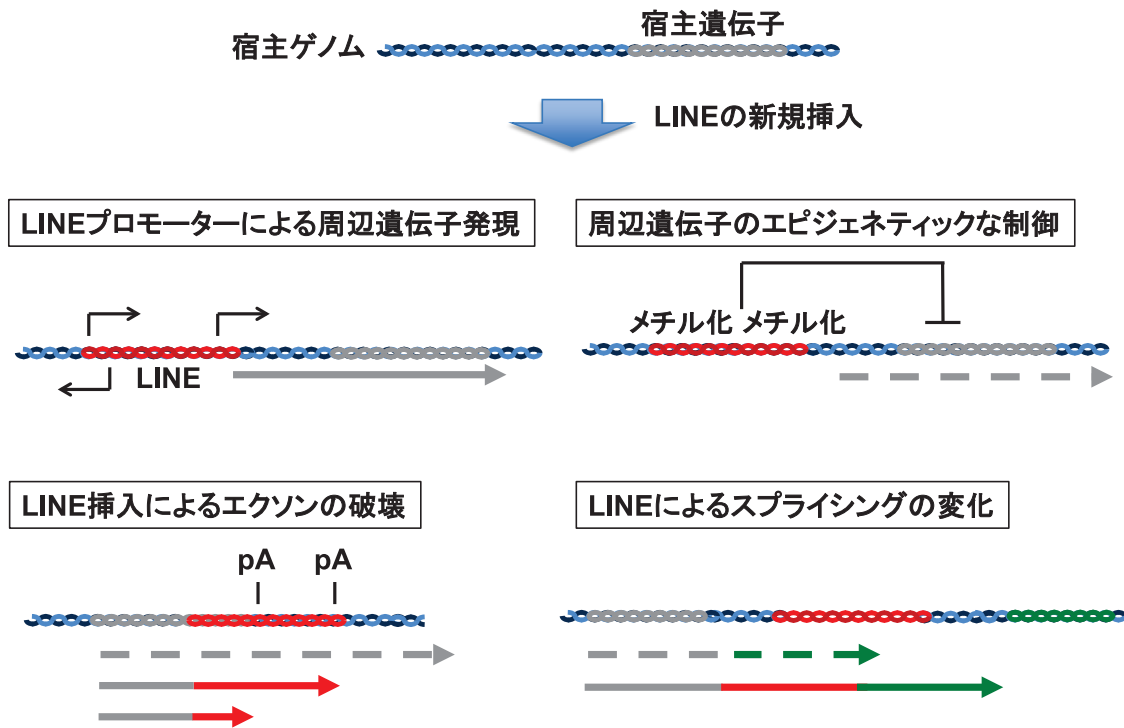


図5 LINE の新規挿入による周辺遺伝子の発現変化

LINE の新規挿入は、LINE の持つ両方向へのプロモーター活性により、周辺遺伝子の発現を誘導する。挿入されたLINE は、DNA メチル化のターゲットとなり、周辺遺伝子にもエピジェネティックな影響を与える。エクソンにLINE が挿入されると、その遺伝子が破壊される。イントロンにLINE が挿入されると、遺伝子のスプライシングパターンが変化する。赤、緑、灰色の実線矢印は発現する mRNA、破線矢印は発現減少する mRNA を示す。

るいは複製を制御している可能性が考えられる^{31, 33)}。このような例は、既に一部の内在性レトロウイルス遺伝子について報告されている³⁴⁾。実際、私たちは、ジリスのゲノムに存在する EBLN 配列から作られるタンパク質 (itEBLN タンパク質) が BDV の感染を抑制することを見出している³⁵⁾。itEBLN タンパク質は、BDV の本体であるウイルスリボタンパク複合体に取り込まれることから、N タンパク質のドミナントネガティブ体として働き、BDV 複製を抑制していると考えられる。BDV 感染においては、感染細胞ゲノム中に BDV 遺伝子の一部が組み込まれることで、その転写産物がウイルスタンパク質の発現量バランスを変化させ、BDV 感染による病原性を制御している可能性が考えられる。

また、私たちは EBLN の RNA としての機能を示唆するデータも得ている。ヒトやマウスでは、精巣特異的に発現し、piRNA (PIWI-interacting RNA) となっている EBLN が存在している (論文投稿中)。piRNA は、レトロトランスポゾンなどの転移因子を抑制することで、それらによる DNA 損傷など有害変異からゲノムを防御する低分子 RNA である³⁶⁾。piRNA 前駆体は、ゲノム上に形成されたクラスター (piRNA クラスター) から転写された長い一本鎖

RNA であると考えられている³⁷⁾。私たちは、EBLN が挿入されているゲノム領域が、この piRNA クラスターであることが多いことに着目している。感染細胞では、宿主ゲノムの piRNA クラスターにボルナウイルスの配列を取り込むことで、ボルナウイルスに対する piRNA を産生し、ボルナウイルス感染を抑制している可能性がある。これはちょうど、近年ゲノム編集で話題になっている細菌類の適応免疫の一種である CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins) 系の動物細胞版と考えられる³⁸⁾。EBLN をもつそれぞれの生物系統で、EBLN 獲得以降、新しいボルナウイルスの内在化が起こっていないようにみえるのは、このような系の存在を支持しているのかも知れない。

3-4. BDV 感染による宿主ゲノム改変と BDV 神経病原性

BDV mRNA の感染細胞のゲノムへのインテグレーション現象の生理意義を考える上で、LINE の生理意義も示唆深い (図5)。LINE の挿入が起こると、近傍の遺伝子に様々な影響を及ぼすことが知られている³⁰⁾。ある遺伝子のエクソン部分への LINE 挿入は、その遺伝子の破壊もしくは機能変化につながる。イントロンに挿入されると、新たなスプライシングサイトを形成し、その遺伝子のスプライシ

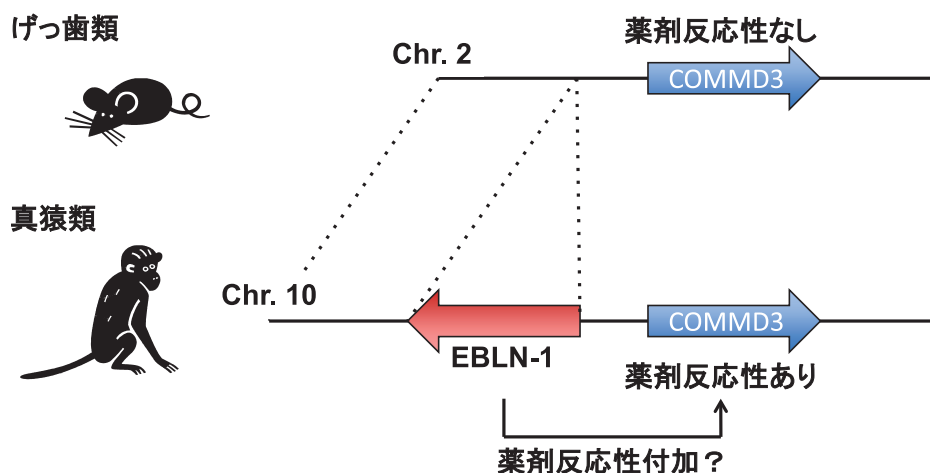


図6 EBLN-1による周辺遺伝子の転写制御

真猿類のEBLN-1と相同なげっ歯類の遺伝子座にEBLNは存在しない。真猿類では、EBLN-1の上流に位置するCOMMD3の発現は、酪酸ナトリウム添加により低下する（薬剤反応性あり）。一方、げっ歯類では酪酸ナトリウム添加により、COMMD3発現量は変化しない（薬剤反応性なし）。両者の比較から、EBLN-1が薬剤反応性をCOMMD3領域に付加したものと考えられる。

ングパターンを変化させることもある。遺伝子間領域へLINE挿入が起こると、LINE自身が持つ両方向へのプロモーター活性により、上流、下流いずれに位置する遺伝子もRNAへの転写量が変化しうる。このようなトランスクリプトームの質的、量的な変化は、神経機能に影響を与えらる^{30,39)}。実際、環境刺激による学習を行なった動物では、LINE転移が増加していることや、LINE転移により神経新生が増加することなどが報告されている^{39,40)}。また、統合失調症などの精神疾患でも、LINE転移が変化していることが報告されている⁴¹⁾。これらの報告は、LINEによる高次機能制御の可能性を示唆するものである。

それでは、BDV mRNA配列のゲノムへの挿入でも同じようなことが起こりうるのだろうか？もし、起こるのであれば、現存のEBLNでも同じような周辺遺伝子の制御が起こっているはずである。ヒトEBLN-1の転写を薬剤で誘導した時に、上流の遺伝子であるCOMMD3の発現は低下した。ヒトを含む真猿類とげっ歯類は共に、ゲノムにEBLNを有している。しかし、これらは別々のインテグレーションイベントにより形成されたものであるため、EBLNが存在する遺伝子座位は、両者の間で相同ではない（図6）。つまり、ヒトEBLN-1の遺伝子座位と相同なマウスの遺伝子座位にはEBLNは存在しない。マウスでは、ヒトの場合と同様の薬剤処理をしても、COMMD3の発現レベルに変化はなかった。これらの結果から、少なくともヒトEBLN-1は周辺遺伝子の発現レベルを制御しうるということが明らかとなった（論文投稿中）。このことから、感染細胞においても、BDV mRNA配列が、宿主ゲノムへの挿入後、挿入部位の周辺遺伝子の発現を制御しうることを示唆され

る。特定の感染神経細胞において、このような変化が神経機能に重要な遺伝子で起きた時に、その神経細胞が関与する神経回路の異常を来す。その異常のパターンにより様々なBDV感染病態の発現につながるのかも知れない。実際、統合失調症患者では、シナプス機能に関与する遺伝子の近傍にLINEの新規挿入が起きており、LINEの新規挿入と統合失調症の病態との関連が疑われている⁴¹⁾。

おわりに

BDVの魅力は、中枢神経系に感染し、その機能変容を通じて、精神疾患様の病原性を誘導することである。本稿で紹介したBDV感染の病態研究は、RNAウイルスの病原性発現機構のみならず、自閉症をはじめとする精神疾患の分子病態についても新しい示唆を与えるものである。しかしながら、BDV感染症の病態解明は、未だ緒についたばかりである。また、私たちが解明したBDVのmRNAの宿主ゲノムへのインテグレーションは、RNAウイルスに共通の新しい感染現象として注目されている⁴²⁻⁴⁵⁾。この現象の生理意義、特にウイルス感染病態への関与に関しては、全くわかっていない。本稿で解説したウイルス感染病態に与える影響は、どれも仮説の域を出ず、今後の検討が必要である。今後も引き続きBDV感染の病態研究を多方面から推進し、RNAウイルスによる中枢神経系異常の病態、ひいては精神疾患の病態まで、その一端の解明に貢献していきたい。

謝辞

本研究は、大阪大学微生物病研究所および東京大学医科

学研究所，京都大学ウイルス研究所にて行なったものであり，京都大学ウイルス研究所の朝長啓造先生をはじめ多くの先生方や研究仲間にご支援を頂きました。この場を借りて深く感謝申し上げます。また，杉浦奨励賞にご推薦くださいました，阪大微生物病研究会観音寺研究所の生田和良先生，京都大学ウイルス研究所の松岡雅雄先生，朝長啓造先生，本研究をご評価頂きました日本ウイルス学会の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Honda T., Tomonaga K. Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in borna disease virus infection. *Viruses* 5: 1978–1990, 2013.
- 2) Tomonaga K., Kobayashi T., Ikuta K. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect* 4: 491–500, 2002.
- 3) Kuhn J. H., Dürrwald R., Bao Y., Briese T., Carbone K., Clawson A. N., DeRisi J. L., Garten W., Jahrling P. B., Kolodziejek J., Rubbenstroth D., Schwemmler M., Stenglein M., Tomonaga K., Weissenböck H., Nowotny N. Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Arch Virol* 160: 621–632, 2015.
- 4) Pletnikov M. V., Rubin S. A., Vasudevan K., Moran T. H., Carbone K. M. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res* 100: 43–50, 1999.
- 5) Hagiwara K., Kamitani W., Takamura S., Taniyama H., Nakaya T., Tanaka H., Kirisawa R., Iwai H., Ikuta K. Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Vet Microbiol* 72: 207–216, 2000.
- 6) Okamoto M., Furuoka H., Hagiwara K., Kamitani W., Kirisawa R., Ikuta K., Taniyama H. Borna disease in a heifer in Japan. *Vet Rec* 150: 16–18, 2002.
- 7) Solbrig M. V., Koob G. F. Neuropharmacological sequelae of persistent CNS viral infections: lessons from Borna disease virus. *Pharmacol Biochem Behav* 74: 777–787, 2003.
- 8) Honda T., Horie M., Daito T., Ikuta K., Tomonaga K. Molecular chaperone BiP interacts with Borna disease virus glycoprotein at the cell surface. *J Virol* 83: 12622–12625, 2009.
- 9) Honda T., Tomonaga K. Host molecular chaperones: Cell surface receptors for viruses. *Heat Shock Proteins* (Henderson B, ed.) Springer Netherlands. 7: 293–307, 2013.
- 10) Gosztanyi G., Ludwig H. Interactions of viral proteins with neurotransmitter receptors may protect or destroy neurons. *Curr Top Microbiol Immunol* 253: 121–144, 2001.
- 11) Rubio M. E., Wenthold R. J. Calnexin and the immunoglobulin binding protein (BiP) coimmunoprecipitate with AMPA receptors. *J Neurochem* 73: 942–948, 1999.
- 12) Lee B.-J., Watanabe M., Kamitani W., Baba S., Yamashita M., Kobayashi T., Tomonaga K., Ikuta K. Age- and host-dependent control of Borna disease virus spread in the developing brains of gerbils and rats. *Microbes Infect* 5: 1195–1204, 2003.
- 13) Billaud J. N., Ly C., Phillips T. R., de la Torre J. C. Borna disease virus persistence causes inhibition of glutamate uptake by feline primary cortical astrocytes. *J Virol* 74: 10438–10446, 2000.
- 14) Ovanesov M. V., Ayhan Y., Wolbert C., Moldovan K., Sauder C., Pletnikov M. V. Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection. *J Neuroinflammation* 5: 50, 2008.
- 15) Kamitani W., Shoya Y., Kobayashi T., Watanabe M., Lee B. J., Zhang G., Tomonaga K., Ikuta K. Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1. *J Virol* 75: 8742–8751, 2001.
- 16) Kamitani W., Ono E., Yoshino S., Kobayashi T., Taharaguchi S., Lee B. J., Yamashita M., Kobayashi T., Okamoto M., Taniyama H., Tomonaga K., Ikuta K. Glial expression of Borna disease virus phosphoprotein induces behavioral and neurological abnormalities in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8969–8974, 2003.
- 17) Honda T., Fujino K., Okuzaki D., Ohtaki N., Matsumoto Y., Horie M., Daito T., Itoh M., Tomonaga K. Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic mice that express Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* 85: 4567–4571, 2011.
- 18) Blatt G. J. The neuropathology of autism. *Scientifica* 2012: 703675, 2012.
- 19) Courchesne E., Yeung-Courchesne R., Press G. A., Hesselink J. R., Jernigan T. L. Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *N Engl J Med* 318: 1349–1354, 1988.
- 20) Payet L. D., Wang X.-H., Baxter R. C., Firth S. M. Amino- and carboxyl-terminal fragments of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 cooperate to bind IGFs with high affinity and inhibit IGF receptor interactions. *Endocrinology* 144: 2797–2806, 2003.
- 21) D'Ercole A. J., Ye P., Calikoglu A. S., Gutierrez-Ospina G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 13: 227–255, 1996.
- 22) Sullivan K. A., Kim B., Feldman E. L. Insulin-like growth factors in the peripheral nervous system. *Endocrinology* 149: 5963–5971, 2008.
- 23) Itoh M., Ide S., Takashima S., Kudo S., Nomura Y., Segawa M., Kubota T., Mori H., Tanaka S., Horie H., Tanabe Y., Goto Y. Methyl CpG-binding protein 2 (a mutation of which causes Rett syndrome) directly regulates insulin-like growth factor binding protein 3 in mouse and human brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 117–123, 2007.
- 24) Riikonen R., Makkonen I., Vanhala R., Turpeinen U., Kuikka J., Kokki H. Cerebrospinal fluid insulin-like growth factors IGF-1 and IGF-2 in infantile autism. *Dev Med Child Neurol* 48: 751–755, 2006.
- 25) Canitano R. New experimental treatments for core social domain in autism spectrum disorders. *Front Pediatr* 2: 61, 2014.

- 26) Steinman G., Mankuta D. Insulin-like growth factor and the etiology of autism. *Med Hypotheses* 80: 475–480, 2013.
- 27) Horie M., Honda T., Suzuki Y., Kobayashi Y., Daito T., Oshida T., Ikuta K., Jern P., Gojobori T., Coffin J. M., Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463: 84–87, 2010.
- 28) Esnault C., Maestre J., Heidmann T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet* 24: 363–367, 2000.
- 29) Maestre J., Tchénio T., Dhellin O., Heidmann T. mRNA retroposition in human cells: processed pseudogene formation. *EMBO J* 14: 6333–6338, 1995.
- 30) Singer T., McConnell M. J., Marchetto M. C. N., Coufal N. G., Gage F. H. LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes? *Trends Neurosci* 33: 345–354, 2010.
- 31) Horie M., Kobayashi Y., Suzuki Y., Tomonaga K. Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20120499, 2013.
- 32) Ewing R. M., Chu P., Elisma F., Li H., Taylor P., Climie S., McBroom-Cerajewski L., Robinson M. D., O'Connor L., Li M., Taylor R., Dharsee M., Ho Y., Heilbut A., Moore L., Zhang S., Omatsky O., Bukhman Y. V., Ethier M., Sheng Y., Vasilescu J., Abu-Farha M., Lambert J., Duewel H. S., Stewart I. I., Kuehl B., Hogue K., Colwill K., Gladwish K., Muskat B., Kinach R., Adams S., Moran M. F., Morin G. B., Topaloglou T., Figeys D. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 3: 89, 2007.
- 33) Feschotte C. Virology: Bornavirus enters the genome. *Nature* 463: 39–40, 2010.
- 34) Jern P., Coffin J. M. Effects of retroviruses on host genome function. *Annu Rev Genet* 42: 709–732, 2008.
- 35) Fujino K., Horie M., Honda T., Merriman D. K., Tomonaga K. Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 13175–13180, 2014.
- 36) Siomi M. C., Sato K., Pezic D., Aravin A. A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 246–258, 2011.
- 37) Brennecke J., Aravin A. A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G. J. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128: 1089–1103, 2007.
- 38) Mali P., Yang L., Esvelt K. M., Aach J., Guell M., DiCarlo J. E., Norville J. E., Church G. M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823–826, 2013.
- 39) Kuwabara T., Hsieh J., Muotri A., Yeo G., Warashina M., Lie D. C., Moore L., Nakashima K., Asashima M., Gage F. H. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 12: 1097–1105, 2009.
- 40) Muotri A. R., Zhao C., Marchetto M. C. N., Gage F. H. Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus. *Hippocampus* 19: 1002–1007, 2009.
- 41) Bundo M., Toyoshima M., Okada Y., Akamatsu W., Ueda J., Nemoto-Miyachi T., Sunaga F., Toritsuka M., Ikawa D., Kakita A., Kato M., Kasai K., Kishimoto T., Nawa H., Okano H., Yoshikawa T., Kato T., Iwamoto K. Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron* 81: 306–313, 2014.
- 42) Belyi V. A., Levine A. J., Skalka A. M. Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog* 6: e1001030, 2010.
- 43) Taylor D. J., Leach R. W., Bruenn J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evol Biol* 10: 193, 2010.
- 44) Koonin E. V. Taming of the shrewd: novel eukaryotic genes from RNA viruses. *BMC Biol* 8: 2, 2010.
- 45) Holmes E. C. The Evolution of Endogenous Viral Elements. *Cell Host Microbe* 10: 368–377, 2011.

Neuropathogenesis of persistent infection with Borna disease virus

Tomoyuki HONDA

Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Kawahara-cho Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

E-mail: thonda@virus.kyoto-u.ac.jp

Borna disease virus (BDV), belonging to the non-segmented, negative-stranded RNA viruses, persistently infects the central nervous system of many mammals. Neonatal BDV infection in rodent models induces neurodevelopmental disturbance without overt inflammatory responses, resulting in a wide range of neurobehavioral abnormalities, such as anxiety, abnormal play behaviors, and cognitive deficits, resembling those of autism patients. Therefore, studies of BDV could provide a valuable model to investigate neuropathogenesis of neurodevelopmental disorders. However, the detailed neuropathogenesis of BDV has not been revealed. Here, we proposed two novel mechanisms that may contribute to BDV neuropathology. The first mechanism is abnormal IGF signaling. Using transgenic mice expressing BDV P protein in glial cells (P-Tg) that show neurobehavioral abnormalities resembling those in BDV-infected animals, we found that the upregulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein 3 in the astrocytes disturbs the IGF signaling and induces the Purkinje cell loss in BDV infection. The other is the integration of BDV sequences into the host genome. We recently found that BDV mRNAs are reverse-transcribed and integrated into the genome of infected cells. BDV integrants have the potential to produce their translated products or piRNAs, suggesting that BDV might exhibit the pathogenicity thorough these molecules. We also demonstrated that BDV integrants affect neighboring gene expression. Collectively, BDV integrants may alter transcriptome of infected cells, affecting BDV neuropathology.